

# Scientific Bulletin of Namangan State University

---

Volume 1 | Issue 7

Article 18

---

9-10-2019

## DEVELOPMENT OF HPLC METHOD FOR THE SEPARATION OF GINSENOZIDES USING POLYVINYL ALCOHOL BONDED STATIONARY PHASE

Azamjon Bakhodirovich Soliev

*Center of Genomics and Bioinformatics AS Uzbekistan Turin Polytechnic University in Tashkent PhD in Biology*

Follow this and additional works at: <https://uzjournals.edu.uz/namdu>

 Part of the [Education Commons](#)

---

### Recommended Citation

Soliev, Azamjon Bakhodirovich (2019) "DEVELOPMENT OF HPLC METHOD FOR THE SEPARATION OF GINSENOZIDES USING POLYVINYL ALCOHOL BONDED STATIONARY PHASE," *Scientific Bulletin of Namangan State University*. Vol. 1 : Iss. 7 , Article 18.

Available at: <https://uzjournals.edu.uz/namdu/vol1/iss7/18>

This Article is brought to you for free and open access by 2030 Uzbekistan Research Online. It has been accepted for inclusion in Scientific Bulletin of Namangan State University by an authorized editor of 2030 Uzbekistan Research Online. For more information, please contact [brownman91@mail.ru](mailto:brownman91@mail.ru).

---

## DEVELOPMENT OF HPLC METHOD FOR THE SEPARATION OF GINSENOZIDES USING POLYVINYL ALCOHOL BONDED STATIONARY PHASE

Cover Page Footnote

???????

Erratum

???????

## РАЗРАБОТКА ВЭЖХ МЕТОДА РАЗДЕЛЕНИЯ ГИНСЕНОЗИДОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПОЛИВИНИЛ СПИРТ СВЯЗАННОЙ СТАЦИОНАРНОЙ ФАЗЫ

Солиев Аъзамжон Баходирович

Центр Геномики и биоинформатики АН РУз,

Туринский политехнический университет в г. Ташкенте

доктор философии (PhD) по биологическим наукам

**Аннотация:** Разработан высокоэффективный жидкостной хроматографический (ВЭЖХ) метод для одновременного количественного анализа семи гинсенозидов, Rb1, Rb2, Rc, Rd, Re, Rf и Rg1. Хроматографическое разделение аналитов было достигнуто менее чем за 20 минут с использованием колонки, связанной с поливиниловым спиртом, с УФ-детектированием при 203 нм в изократическом режиме мобильной фазе, состоящий из ацетонитрила и воды-82,5/17,5 об/об. Разработанный метод был апробирован в диапазоне концентраций 10-120 мкг/мл аналитов. Точность, основанная на значениях номинальной концентрации, находилась в диапазоне 98,7–100,8%. Предел обнаружения составлял от 0,43 до 1,03 мкг/мл, а предел количественного определения составлял от 1,42 до 3,13 мкг/мл.

**Ключевые слова:** высокоэффективная жидкостная хроматография, поливинил спирт связанная фаза, гинсенозиды.

## ПОЛИВИНИЛ СПИРТ БОГЛАНГАН СТАЦИОНАР ФАЗА ЁРДАМИДА ГИНСЕНОЗИДЛАР АЖРАЛИШИНING ЮССХ УСУЛИНИ ЯРАТИШ

Солиев Аъзамжон Баходирович

ЎзР ФА Геномика ва биоинформатика маркази

Тошкентдаги Турин политехника университети

Биология фанидан фалсафа доктори (PhD)

**Аннотация:** Бир вақтнинг ўзида етти хил гинсенозидлар стандартлари Rb1, Rb2, Rc, Rd, Re, Rf ва Rg1 миқдорий таҳлилининг юқори самарадор суюқлик хроматография (ЮССХ) усули яратилди. Хроматографик ажралиш 20 миндан кам вақт ичида поливинил спирти боғланган колонкада, 203 нм УБ тўлқин узунлигида, мобил фазанинг ацетонитрил/сув - 82,5/17,5 ҳ/ҳ изократик оқим режимида олиб борилди. Яратилган усул моддаларнинг 10-120 мкг/мл концентрация оралигида тегишли кўрилди. Номинал концентрация қийматларига асосланган аниқлик 98,7–100,8% оралигида эканлиги аниқланди. Аниқланиш чегараси 0,43 дан 1,03 мкг/млгача, миқдорий аниқланиш чегараси эса 1,42 дан 3,13 мкг/млгача эканлиги ҳисобланди.

**Калит сўзлар:** юқори самарадор суюқлик хроматографияси, поливинил спирт боғланган фаза, гинсенозидлар.

## DEVELOPMENT OF HPLC METHOD FOR THE SEPARATION OF GINSENOZIDES USING POLYVINYL ALCOHOL BONDED STATIONARY PHASE

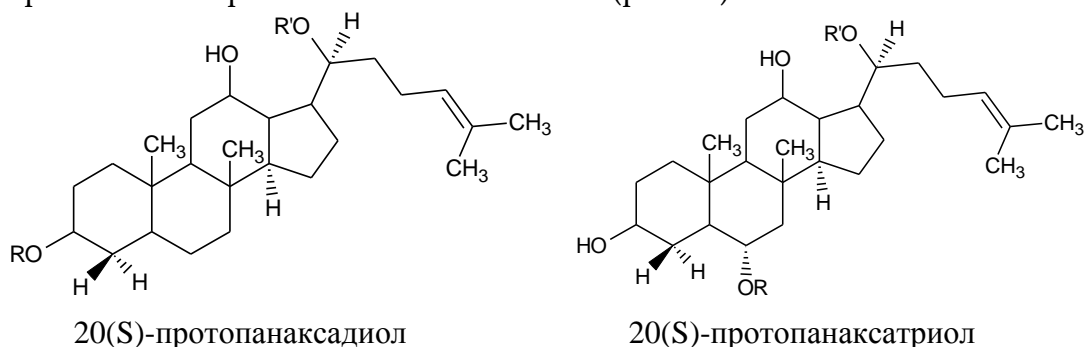
Soliev Azamjon Bakhodirovich

Center of Genomics and Bioinformatics AS Uzbekistan  
Turin Polytechnic University in Tashkent  
PhD in Biology

**Abstract:** A highly efficient HPLC method has been developed for the simultaneous quantitative analysis of seven ginsenosides, Rb1, Rb2, Rc, Rd, Re, Rf and Rg1. Chromatographic separation of analytes was achieved in less than 20 minutes using a polyvinyl alcohol bonded column, with UV detection at 203 nm in the isocratic mode of the mobile phase, consisting of acetonitrile and water-82.5/17.5 v/v. The developed method was tested in the concentration range of 10-120 µg/ml analytes. Accuracy based on the values of the nominal concentration was in the range of 98.7–100.8%. The detection limit was from 0.43 to 1.03 µg/ml, and the quantification limit was from 1.42 to 3.13 µg/ml.

**Key words:** high performance liquid chromatography, polyvinyl alcohol bonded phase, ginsenosides.

**Введение** Женьшень является одним из наиболее широко используемых растительных лекарственных средств, который ценят за его терапевтическую и фармакологическую активность [1,2]. Более 30 гинсенозидов были идентифицированы у этого растения [3], но наиболее распространенными гинсенозидами являются Rb1, Rb2, Rc и Rd, которые содержат 20(S)-протопанаксадиол в качестве агликона (рис.1а) и Rg1, Rf и Re, которые содержат 20(S)-протопанаксатриол в качестве агликона (рис.1б).



Rb1: R=D-Glc(β1-2)D-Glc

Re: R=L-Rha(α1-2)D-Glc

Rb2: R=D-Glc(β1-2)D-Glc

Rf: R=D-Glc

Rc: R=D-Glc(β1-2)D-Glc

Rg1: R=D-Glc

Rd: R=D-Glc(β1-2)D-Glc

Rf: R=D-Glc

Стандартизация женьшеня обычно основана на содержании именно этих компонентов, которая осуществляется с помощью ВЭЖХ метода в обращенной фазе, но является недостаточно надежной. В данной работе было проведено исследование для разработки простого хроматографического метода с использованием ПВС модифицированной неподвижной фазы для разделения и количественного определения семи гинсенозидов. ПВС модифицированная стационарная фаза была выбрана из-за своей стабильности по отношению

буферов с высоким и низким рН, сильных растворителей, а также различной селективности, которую может предложить винильная группа.

### **Экспериментальная часть**

Семь стандартных гинсенозидов (Rb1, Rb2, Rc, Rd, Re, Rf и Rg1) были приобретены у Extrasynthese (Франция). ВЭЖХ градиентный ацетонитрил, используемый в качестве подвижной фазы, и метанол, использованный для приготовления образца, были получены от Wako Pure Chemical Industries (Япония). Воду очищали с помощью системы очистки воды Milli-Q (Япония). Исходные растворы (500 мкг/мл) стандартов готовили путем растворения точно взвешенных количеств стандартов в метаноле. Стандартные растворы для построения калибровочных кривых ежедневно готовили из исходных растворов путем разбавления метанолом для получения растворов с концентрациями в диапазоне от 10 до 120 мкг/мл.

### **ВЭЖХ анализ**

Хроматограф, использованный в этом исследовании, представлял собой систему ВЭЖХ Nanospace SI-2 (Shiseido, Япония), состоящий из двухканального дегазатора, инертного насоса, автосамплера, колоночной печи и детектора UV-Vis. Контроллер системы S-MicroChrom (S-MC) (Shiseido, Япония) использовался для управления работой системы ВЭЖХ. Разделение гинсенозидов было достигнуто на колонке YMC-Pack PVA-Sil (5  $\mu$ м, 250 мм  $\times$  2 мм в.д.). Детекцию аналитов проводили при 203 нм. Для сбора и обработки данных использовалось программное обеспечение Borwin Chromatography Data Processing (Jasco, Япония), работающее на персональном компьютере.

### **Валидация метода**

Пределы линейности, обнаружения и количественного определения, а также калибровочные кривые для всех семи стандартов были построены с 7 концентрациями в диапазоне 10-120 мкг/мл. Площади пиков стандартов наносили на график в зависимости от концентрации, и линейность оценивали с помощью линейного регрессионного анализа. Предел обнаружения был рассчитан по  $ПО = 3,3\sigma/S$ , где  $\sigma$  – стандартное отклонение бланка, а  $S$  – уклон калибровочной кривой. Предел количественного определения был рассчитан по  $ПКО = 10\sigma/S$  в соответствии с руководящими принципами ICH, Q2B (Методология валидации аналитических процедур) [4].

### **Точность и достоверность**

Точность метода анализа была определена как внутри дня (внутридневная повторяемость), так и между днями (промежуточная точность) с использованием трех стандартов Rf, Rd и Rb1 при трех уровнях концентрации. Достоверность анализа была рассчитана путем анализа трех известных образцов три раза в день, чтобы определить внутрисуточную изменчивость, и в течение трех последовательных дней, чтобы определить межсуточную вариацию. Точность рассчитывали, как процент от номинальных концентраций.

### **Результаты и обсуждение**

Основная цель оптимизации в хроматографии состоит в том, чтобы найти условие, которое даст адекватное разделение всех компонентов смеси в разумные сроки. В этом случае экспериментальный дизайн (ЭД) был использован для определения оптимальных хроматографических условий для разделения семи стандартных гинсенозидов с использованием поливинил спирт (ПВС) модифицированной неподвижной фазы. ЭД представлял запланированную серию экспериментов с изменяющимися переменными, которые описывают эксперимент наиболее эффективным образом, чтобы найти оптимальные настройки переменных для дальнейшей оценки [5]. Цель ЭД-получить лучшее описание поверхности отклика, которая представляет собой трехмерный график, показывающий влияние одной или нескольких переменных на ответный результат.

Сначала проводились предварительные исследования по определению хроматографических параметров, сильно влияющих на разделение гинсенозидов на ПВС модифицированной колонке. Среди переменных процентное содержание ацетонитрила (% ACN) в мобильной фазе и температура колонки являются теми, которые оказывают большое влияние на удержание и разделение аналитов. В дополнение к этим двум переменным, была также включена скорость потока и был построен трехфакторный центральный композитный дизайн (ЦКД) с использованием программного обеспечения Unscrambler 9.6 (CAMO Inc., Норвегия) (рис. 2). Всего было проведено 16 экспериментов для определения значения трех переменных для каждого прогона. Функция отклика, определенная Кайзером [6], использовалась в качестве экспериментального отклика для каждого хроматографического прогона. Функция отклика  $R_f$  учитывает эффективность разделения и время анализа.

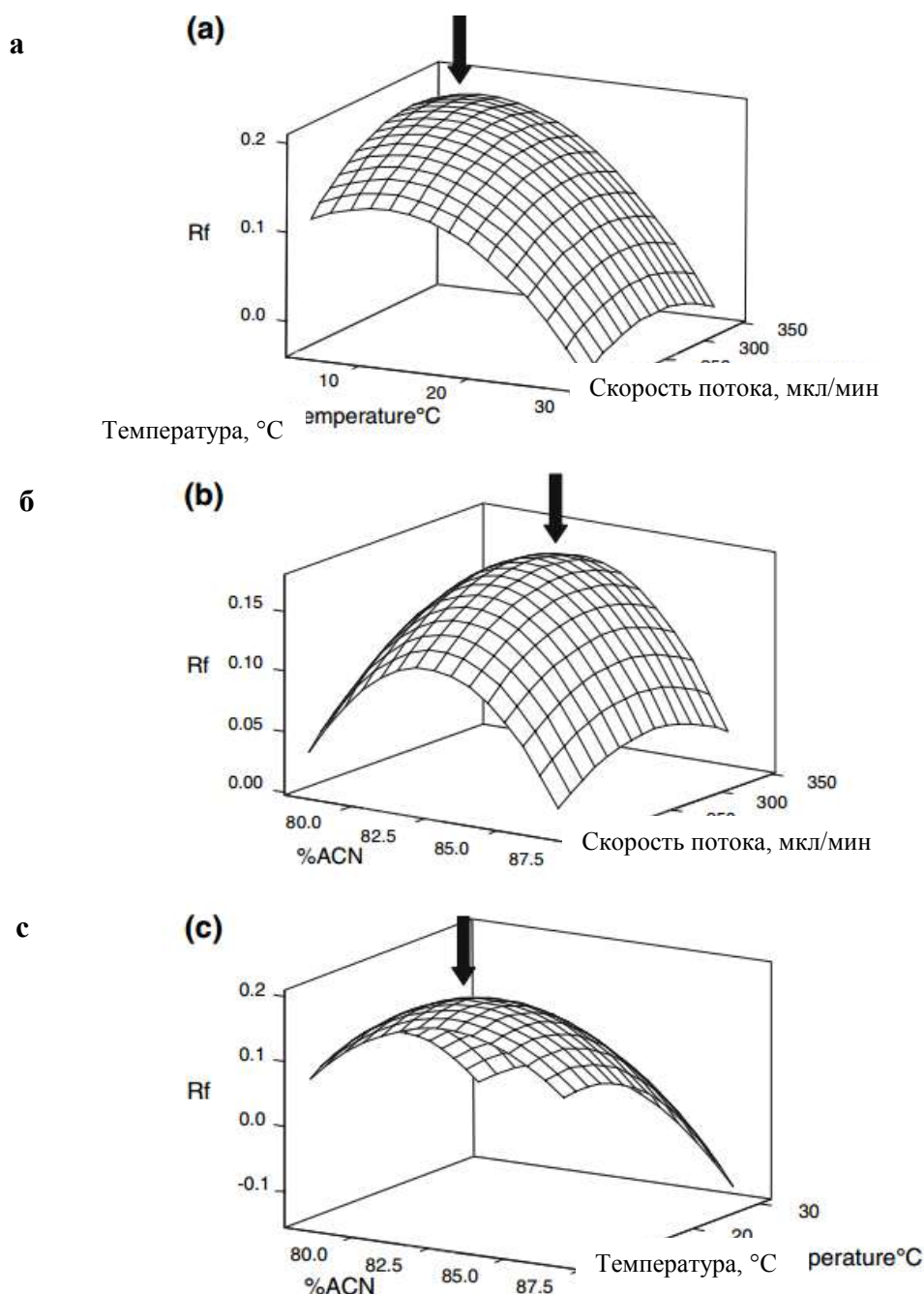


Рис. 2. Графики отклика поверхности, оцененные по ЦКД для, а зависимости температуры от скорости потока при постоянной концентрации ACN, равной 82,5%, б %-ое содержание ACN по отношению скорости потока при постоянной температуре, равной 17,5°C, и с %-ое содержание ACN по отношению температуры при постоянной скорости потока 250 мкл/мин. Стрелки указывают максимальные точки графиков

Из рисунков 2 а и с видно, что высокие значения  $R_f$  могут быть получены при более низкой температуре. Используя полученную квадратичную модель и графики поверхности отклика, были найдены условия, которые привели к наибольшему значению  $R_f$ : %ACN 82,5%, температура 9°C и скорость потока 298



мкл/мин. Эти данные были выбраны в качестве оптимальных хроматографических условий.

На рис. 3 показана хроматограмма семи стандартных гинсенозидов, разделенных на ПВС модифицированной колонке, с использованием оптимизированных условий разделения. Полное разделение всех семи аналитов было достигнуто менее чем за 16 минут. Это значительно короче, чем ранее сообщенное 70-минутное время анализа с использованием C18 колонки и градиентного элюирования [7].

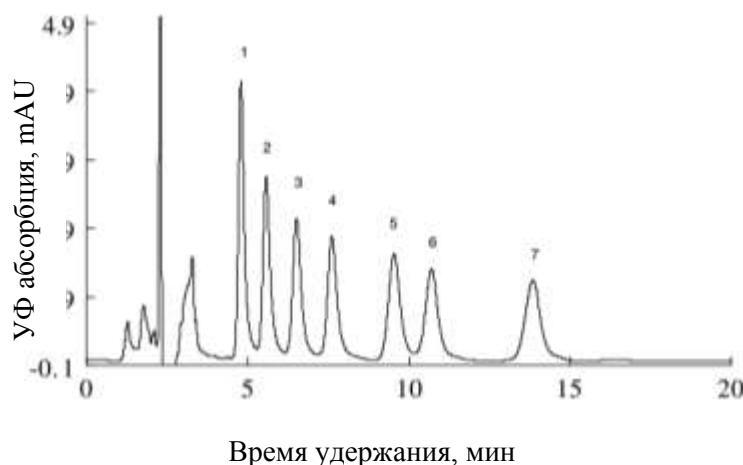


Рис. 3. Типичная хроматограмма для разделения семи стандартных гинсенозидов. Условия хроматографии: колонка-YMC-Pack PVA-Sil (диоксид кремния, модифицированный поливиниловым спиртом, 5  $\mu$ м, 250 мм  $\times$  2,1 мм в.д.); Подвижная фаза, изократическое элюирование смесью ацетонитрил/вода (82,5:17,5); Скорость потока 298 мкл/мин. Температура колонки 9°C; Концентрация образца 200 мкг/мл; объем вводимого образца 5,0 мкл. Пики 1 = Rf; 2=Rg1; 3=Rd; 4=Re; 5=Rc; 6=Rb2; и 7=Rb1.

**Таблица 1**

**Калибровочные кривые и чувствительность для определения стандартных гинсенозидов**

Гинсенозид	Калибровочная кривая <sup>а</sup>	Коэффициент корреляции, R <sup>2</sup>	ПО, мкг/мл	ПКО, мкг/мл
Rf	$y=1391,47x-5168,46$	0,9984	0,996	3,017
Rg1	$y=1370,28x-7483,43$	0,9985	1,033	3,130
Rd	$y=869,68x-2457,42$	0,9998	0,813	2,463
Re	$y=1264,45x-2036,59$	0,9985	0,426	1,291
Rc	$y=926,54x-4562,91$	0,9988	0,469	1,422
Rb2	$y=826,91x-2485,93$	0,9993	0,824	2,497
Rb1	$y=844,82x-1535,14$	0,9998	0,950	2,880

Семь измерений при семи уровнях концентрации в диапазоне 10-120 мкг/мл.

<sup>а</sup>площадь пика у; x концентрация (мкг/мл)



Таблица 2

Точные и достоверные данные по определению трех типичных контрольных образцов гинсенозида

Гинсенозид	Конц. контрольного образца, мкг/мл	Внутридневные изменения (n=3)		
		Измеренный <sup>а</sup> , мкг/мл	ОСО <sup>б</sup> , %	Точность <sup>с</sup> , %
Rf	90,00	90,07±0,06	0,07	100,1
	50,00	50,27±0,07	0,13	100,5
	30,00	30,18±0,11	0,37	100,6
Rd	90,00	90,08±0,09	0,10	100,1
	50,00	49,48±0,21	0,42	99,0
	30,00	29,90±0,05	0,17	99,7
Rb1	90,00	90,15±0,12	0,14	100,2
	50,00	50,03±0,08	0,16	100,1
	30,00	30,23±0,11	0,36	100,8

Гинсенозид	Конц. контрольного образца, мкг/мл	Междневные изменения (n=3)		
		Измеренный <sup>а</sup> , мкг/мл	ОСО <sup>б</sup> , %	Точность <sup>с</sup> , %
Rf	90,00	90,14±0,07	0,07	100,2
	50,00	50,42±0,20	0,39	100,8
	30,00	30,21±0,05	0,16	100,7
Rd	90,00	89,96±0,26	0,28	99,9
	50,00	49,56±0,17	0,34	99,1
	30,00	29,62±0,24	0,83	98,7
Rb1	90,00	90,10±0,07	0,07	100,1
	50,00	50,09±0,06	0,11	100,2
	30,00	30,13±0,11	0,35	100,4

<sup>а</sup>Средние значения с ± стандартным отклонением

<sup>б</sup>Относительное стандартное отклонение

<sup>с</sup>Точность (%) = (Среднее измеренное значение/Номинальное значение)×100

Калибровочные кривые для семи гинсенозидов были построены путем построения графика площади пика аналитов в зависимости от соответствующих концентраций. Линейность графиков оценивалась по коэффициентам корреляции ( $R^2$ ). Все калибровочные кривые были линейными в диапазоне концентраций 10-120 мкг/мл при  $R^2$  до 0,9984. ПО и ПКО находились в диапазоне от 0,426-1,033 до 1,291-3,130 мкг/мл, соответственно. Таблица 1 суммирует эти результаты для семи стандартных гинсенозидов.

Внутри- и межсуточное изменения (повторяемость) и точность метода были определены из трех типичных стандартных растворов (Rf, Rd и Rb1) путем трех повторных анализов концентраций для каждого стандарта. Таблица 2 показывает точность и достоверность данных для трех стандартов Rf, Rd и Rb1. Как видно из

таблицы 2, ОСО значения для внутридневных и междуточных измерений составляли не более 0,42 и 0,83%, соответственно, что указывает на хорошую внутридневную и междневную точность. Высокая точность как для внутридневных (99,0-100,8%), так и для междневных (98,7-100,8%) измерений была также получена для оптимизированного метода.

### **Заключение**

Оптимизированные хроматографические условия, полученные из ЦКД, были эффективными при полном разделении семи гинсенозидов. Все статистические параметры (ОСО, ПО, ПКО и линейность) были приемлемыми. Ожидается, что разработанный метод будет применим для практического применения.

### **References:**

1. Yamaguchi H., Matsuura H., Kasai R., Tanaka O., Satake M., Kohda H., Izumi H., Nuno M., Katsuki S., Isoda S., Shoji J., Goto K. Analysis of Saponins of Wild Panax ginseng. *Chem Pharm Bull.*–1988, Vol 36,-P.4177–4188.
2. Liu C.X., Xiao P.G. Recent advances on ginseng research in China. *J.Ethnopharmacol.*–1992, Vol. 36,-P. 27–38.
3. Park M.K., Park J.H., Han S.B., Shin Y.G., Park I.H. High-performance liquid chromatographic analysis of ginseng saponins using evaporative light scattering detection. *J.Chromatography A.*–1996, Vol. 736,-P. 77–81.
4. Validation of analytical procedures: methodology ICH harmonised tripartite guideline, having reached step 4 of the ICH process at the ICH Steering Committee meeting on 6 November.–1996.
5. Novotna K., Havlis J., Havel J. Optimisation of high performance liquid chromatography separation of neuroprotective peptides: Fractional experimental designs combined with artificial neural networks. *J.Chromatography A.*–2005, Vol. 1096,-P. 50–57.
6. Kaiser R. Gas Chromatographie, Geest und Portig, Leipzig.–1959,-P.33–34.
7. Lou D.W., Saito Y., Jinno K. Simultaneous LC Determination of Ginsenosides Using a Modified Extraction Procedure and an Improved Step Gradient Program, *Chromatographia.*–2005, Vol. 63(1-2),-P. 31–35.